

1602

Sonderdruck

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 322 S. 8—20, 1960

Neue γ -Glutamylpeptide in der Zwiebel
(*Allium cepa*)

Von

Artturi I. Virtanen und E. J. Matikkala

Neue γ -Glutamylpeptide in der Zwiebel (*Allium cepa*)*

Von

Artturi I. Virtanen und E. J. Matikkala

Aus dem Biochemischen Institut der Stiftung für Chemische Forschung, Helsinki

(Der Schriftleitung zugegangen am 13. April 1960)

Herrn Professor Dr. E. Waldschmidt-Leitz zum 65. Geburtstag gewidmet

Bei unseren Untersuchungen über die Zusammensetzung der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) haben wir neben frei vorkommenden schwefelhaltigen Amino- und Iminosäuren (*S*-Methyl- und *S*-*n*-Propyl-cystein-sulfoxid sowie Cycloalliin¹) wenigstens fünf saure Peptide gefunden. Diese werden schon in 0,5–1*n* HCl bei 100° hydrolysiert und könnten deshalb γ -Glutamylpeptide sein. In unserer vorläufigen Mitteilung² haben wir schon kurz berichtet, daß uns die Isolierung von drei γ -Glutamylpeptiden aus der Zwiebel gelungen ist: Zwei konnten in kristalliner Form, das dritte praktisch rein isoliert werden. Die Zusammensetzung und chemische Struktur der in kristalliner Form isolierten Peptide wurden aufgeklärt, für das dritte Peptid konnte eine wahrscheinlich Strukturformel aufgestellt werden.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen haben wir nun das dritte und auch ein viertes Peptid in kristalliner Form isoliert. In dieser Mitteilung wird ausführlich über die Isolierung, Strukturbestimmung und die Eigenschaften der beiden ersten γ -Glutamylpeptide berichtet.

Ergebnisse und Beschreibung der Versuche

γ -L-Glutamyl-L-phenylalanin (Peptid I)

Isolierung: 5 kg in Finnland kultivierte Zwiebeln (*Allium cepa*) wurden mit Kohlensäureeis in Äthanol gefroren und im gefrorenen Zustand in kaltem Äthanol zermalen. Die Lösung enthielt etwa 80% Äthanol. Nach 24stdg. Stehenlassen wurde der Rückstand abfiltriert und mit 80proz. Äthanol gewaschen. Die vereinten Äthanolösungen ließ man durch eine Amberlit-IR-120-Säule fließen, die etwa 1,5 l Harz (200–400 mesh, H-Form) enthielt. Die Säule wurde mit 20 l dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit 25 l 1*n* NH₄OH eluiert. Die ammoniakalische

* Der Rockefeller Foundation sind wir für die Unterstützung der Arbeit zu Dank verpflichtet. Zum Teil wurde die Arbeit im Rahmen eines Forschungsprojekts unter US Public law 480 durchgeführt.

¹ A. I. Virtanen u. E. J. Matikkala, Suomen Kemistilehti B 29, 134 [1956]; 31, 191 [1958]; Acta chem. scand. 13, 623, 1898 [1959]; E. J. Matikkala u. A. I. Virtanen, Suomen Kemistilehti B 30, 219 [1957].

² A. I. Virtanen u. E. J. Matikkala, Suomen Kemistilehti B 33, 83 [1960].

Lösung wurde im Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 120 ml Wasser gelöst und auf einer mit Dowex 1 (200—400 mesh., Acetatform) gefüllten Säule (5 × 40 cm) fraktioniert. Man eluierte anfangs mit Wasser (53 Frakt. à 30 ml), danach mit 0,5*n* Essigsäure. Nachdem 296 Frakt. à 30 ml aufgefangen waren, wurde die Eluierung mit 1*n* HCl fortgesetzt, wobei Fraktionen à 20 ml/30 Min. gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden papierchromatographisch mit Butanol/Essigsäure/Wasser 63:10:27 als Lösungsmittel geprüft. Frakt. 331—362, in welchen eine in 1*n* HCl-Lösung bei 100° hydrolysierbare, unbekannte Substanz beobachtet wurde, wurden vereinigt und in einer Amberlit-IR-120-Säule (2,5 × 66 cm) von Salzsäure befreit. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, und die Substanz mit 1*n* NH₄OH eluiert. Die Lösung wurde im Vak. zur Trockne eingedampft, der gelbe Rückstand in 10 ml Wasser gelöst, und die Lösung unter geringer Erwärmung mit 100 mg Aktivkohle geschüttelt. Nach Filtrieren setzte man der Lösung Methanol zu, wobei die Substanz in farblosen, kleinen Nadeln auskristallisierte. Ausbeute 1,641 g oder 0,033% pro frische Zwiebel. Die Substanz gab auf dem Papierchromatogramm nur einen Fleck, der sich in Butanol/Essigsäure/Wasser etwas schneller als Tyrosin, in Phenol/Wasser (NH₃) gleich schnell wie Tyrosin bewegte.

Die isolierte Substanz entsprach einem der beiden Ninhydrinpositiven Flecken, die auf den zweidimensionalen Chromatogrammen von Zwiebelextrakt unterhalb von Tyrosin vorkamen und die beim Kochen mit 1*n* HCl verschwanden.

Hydrolyse des isolierten Peptides: Die Substanz (10 mg) wurde durch Erhitzen mit 1 ml 0,5*n* HCl auf 104° gespalten. Als Hydrolyseprodukte konnten auf einem zweidimensionalen Papierchromatogramm Glutaminsäure und Phenylalanin identifiziert werden. In Parallelversuchen wurde festgestellt, daß in 0,5*n* HCl bei 100° etwa $\frac{1}{3}$ der Substanz in 1 Stde. hydrolysiert wird; in 3 Stdn. war die Hydrolyse vollständig. Bei starker Hydrolyse (6*n* HCl, 104°, 24 Stdn.) wurden dieselben Hydrolyseprodukte erzielt wie bei milder Hydrolyse. Auf Grund der Hydrolyseversuche war es wahrscheinlich, daß es sich um ein γ -Glutamylpeptid handelte.

Analyse des Peptids: Die Substanz, die sich als Ammoniumsalz eines sauren Peptids erwies, war schwefelfrei.

C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₅ (311,3)	Ber. C 54,01	H 6,80	N 13,50	O 25,70
	Gef. C 53,81	H 6,76	N 13,14	O 26,41

Bei der Destillation von Ammoniak aus der alkalisierten Lösung im Parnas-Wagner-Apparat wurden 4,74% NH₃-N gefunden (ber. 4,50% N aus Ammonium-Kation).

Bestimmung der α -Carboxyl- und α -Aminogruppe (nach Linko³): Bei dieser Methode werden NH₃ und CO₂ bestimmt, die bei der Einwirkung von Ninhydrin aus α -Amino- und α -Carboxylgruppen gebildet werden. Da das Peptid als Ammoniumsalz vorlag, wurde dieses Ammoniak neben der α -Aminogruppe bestimmt.

Bei der Bestimmung der Carboxylgruppe wurden aus 25,1 mg Peptid (NH₄-Salz) 3,50 mg CO₂ erhalten; ber. 3,55 mg pro α -Carboxylgruppe. Bei der Bestimmung von Aminostickstoff wurden aus 25,1 mg 2,70 mg NH₃ erhalten, entsprechend 8,84% N (ber. 9,00% N pro α -NH₂- und NH₄⁺-N).

Auf Grund dieser Resultate müssen α -Amino- und α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure in dem Peptid frei sein.

Die *N*-terminale Aminosäure im Peptid wurde mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol bestimmt. Nach der Reaktion wurde in Ätherextrakt nur DNP-Glutaminsäure papierchromatographisch gefunden. Glutaminsäure ist somit die *N*-terminale Aminosäure.

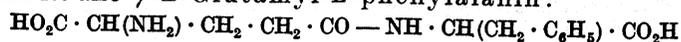
³ P. Linko, Suomen Kemistilehti B 28, 96 [1955].

Konfiguration der Aminosäuren des γ -Glutamylpeptids: Die oben angeführten Versuche und Analysen haben eindeutig bewiesen, daß das isolierte saure Peptid γ -Glutamyl-phenylalanin ist. Um die Konfiguration der Glutaminsäure und des Phenylalanins in dem Peptidmolekül zu bestimmen, wurden 200 mg Peptid in 10 ml 1*n* HCl bei 104° einen Tag hydrolysiert. Die Lösung wurde im Vak. eingedampft und der Rückstand auf einer Dowex-1-Säule fraktioniert. Nachdem Phenylalanin mit Wasser eluiert war, wurde Glutaminsäure mit 0,5*n* Essigsäure eluiert. 83 mg Phenylalanin und 79,5 mg Glutaminsäure wurden kristallin erhalten. Im isolierten Phenylalanin wurde 8,40% N gefunden (ber. 8,47%), in Glutaminsäure 9,38% N (ber. 9,51%). Die Reinheit der Aminosäuren wurde durch Aufnahme der IR-Spektren bestätigt.

Optische Drehung der isolierten Aminosäuren und des Peptids:

Phenylalanin	$[\alpha]_D^{22}$: - 30,6 (in Wasser)
Glutaminsäure	$[\alpha]_D^{23}$: + 33,0 (in 6 <i>n</i> HCl)
γ -Glutamyl-phenylalanin	$[\alpha]_D^{20}$: + 17,3 (in Wasser)

Die Werte zeigen, daß sowohl die Glutaminsäure als auch das Phenylalanin im Peptid L-Formen sind. Das aus Zwiebeln isolierte saure Dipeptid ist also γ -L-Glutamyl-L-phenylalanin:



Die R_F -Werte des Peptids sind in der Tabelle (S. 15) angegeben.

γ -L-Glutamyl-S-[β -carboxy-n-propyl]-cysteinyl-glycin (Peptid II)

Isolierung des Peptids: Bei weiterer Fraktionierung der Peptide auf einer Dowex-1-Säule mit 1*n* HCl trat in den Frakt. 363—373, nachdem γ -Glutamyl-phenylalanin in den Frakt. 331—362 eluiert war, ein anderes, leicht hydrolysierbares Peptid auf, das mit Ninhydrin auf Papier einen rotvioletten Fleck gab. Die Fraktionen wurden vereinigt, und die Lösung durch eine Amberlit-IR-120-Säule geschickt. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde mit 1*n* Ammoniak eluiert. Nachdem die Lösung zur Trockne gebracht war, wurde papierchromatographisch gefunden, daß das Peptid teilweise hydrolysiert war. Durch milde und starke Säurehydrolyse wurden aus dem Peptid drei Aminosäuren gebildet, welche kräftige Flecken auf dem Papierchromatogramm gaben: Glutaminsäure, Glycin und eine unbekannte Aminosäure, welche in einem blaugrünen Fleck mit Ninhydrin kenntlich war.

Das reine Peptid wurde aus 2 kg Zwiebeln so schonend isoliert, daß Hydrolyse durch Salzsäure vermieden wurde: Im Anschluß an die Eluierung von einer Dowex-1-Säule mit 0,5*n* Essigsäure wurde γ -Glutamyl-phenylalanin mit 1*n* Essigsäure eluiert. Nachdem 130 Fraktionen à 14 ml aufgefangen waren, ohne daß das gesuchte Peptid aus der Säule kam, begann man mit 1*n* HCl zu eluieren. Nachdem 5 Fraktionen à 25 ml gesammelt waren, kam das Peptid in den folgenden 25 Fraktionen aus der Säule, wobei noch keine Salzsäure austrat. Die vereinten Fraktionen wurden schonend eingeengt. Durch Acetonzugabe wurde das Peptid ausgefällt. Es war noch nicht chromatographisch rein sondern enthielt noch eine ninhydrinpositive Substanz, welche mit Butanol/Essigsäure/Wasser 63:10:27 etwas langsamer als das gesuchte Peptid wanderte. Durch Fraktionierung auf einer Cellulosesäule (5,5 × 34 cm) mit Butanol/Eisessig/Wasser konnte das Peptid von dieser Substanz getrennt werden. Von einem gelblichen Farbstoff wurde das Peptid durch Ausschütteln seiner wäßrigen Lösung mit etwas Aktivkohle befreit, wonach das Peptid in kleinen farblosen Nadeln kristallisierte. Ausb. 251 mg.

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ (393,4) Ber. C 42,74 H 5,89 N 10,68 O 32,54 S 8,15
Gef. C 41,96 H 6,16 N 9,80 O 33,55 S 7,19

Isolierung der neuen Aminosäure: Frakt. 363—373 der ersten Auftrennung des Peptids aus 5 kg Zwiebeln wurden für die Isolierung der unbekanntenen Aminosäure verwendet. Das eingedampfte Ammoniakeluat wurde in 30 ml 6*n* HCl gelöst und 24 Stdn. bei 104° gehalten. Die Salzsäurelösung wurde im Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand in 8 ml 0,5*n* Essigsäure gelöst und auf einer Dowex-1-Säule (3,4 × 30 cm) fraktioniert. Das Harz war im Gleichgewicht mit 0,5*n* Essigsäure. Fraktionen à 7 ml/30 Min. wurden gesammelt. Glycin kam in Frakt. 10—20, die unbekanntene Aminosäure teilweise zusammen mit Glutaminsäure in Frakt. 54—80, teilweise allein in Frakt. 81—101. Diese wurden im Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in 8 ml Wasser bei 50° gelöst. Im Eisschrank kristallisierte die Aminosäure in kleinen Nadeln aus. Ausb. 249 mg. Nach Eindampfen der Mutterlauge konnte aus Wasser-Aceton-Lösung noch 265 mg krist. Aminosäure zusätzlich erhalten werden. Die Mutterlauge wurde mit Frakt. 54—80, welche neben der neuen Aminosäure Glutaminsäure enthielten, vereint. Nach Eindampfen wurden die Aminosäuren auf einer Cellulosesäule (5,7 × 34 cm) mit Butanol/Essigsäure/Wasser fraktioniert. Auf diese Weise wurden noch weitere 366 mg der neuen Aminosäure in kristalliner Form erhalten. Die Totalausbeute war somit 880 mg. Schmp. 191—194° (Zers.).

C₇H₁₃NO₄S⁻ (207,3) Ber. C 40,59 H 6,28 N 6,76 O 30,90 S 15,48
Gef. C 40,52 H 6,25 N 6,61 O 30,65 S 15,22

Bestimmung der α-Amino- und α-Carboxylgruppen (nach Linko³): Aus der Aminosäure wurde 21,44% CO₂ gebildet (berechnet 21,24%, wenn eine Carboxylgruppe aus dem Molekül C₇H₁₃NO₄S abgespalten wird).

Aus der Aminosäure wurden 6,57% N als Ammoniak abgespalten (berechnet 6,76% N, wenn der Stickstoff total der α-Aminogruppe angehört und somit durch Ninhydrin quantitativ abgespalten wird).

Versuche zur Charakterisierung des Schwefelatoms in der Aminosäure:

Die Aminosäure enthält keine SH-Gruppe, wie mit Nitroprussidnatrium in alkalischer Lösung festgestellt wurde. Aus Jodwasserstoff wird bei Zimmertemperatur kein Jod freigesetzt, so daß keine leicht reduzierbare Gruppe vorliegt.

Mit HJ (57%) + rotem P wurde nur ein kleiner Teil der Aminosäure gespalten. Alanin wurde dabei papierchromatographisch nachgewiesen.

Oxydation mit H₂O₂: 50 mg der Aminosäure wurden in 2,5 ml Eisessig unter gelindem Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde auf 12° gekühlt und mit 30 µl 30proz. Hydroperoxyd versetzt. Nach 4stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur (wiederholtes Umschütteln) wurde im Vak. eingedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Nach Zugabe von Aceton wurden 42,3 mg Kristalle erhalten. Die papierchromatographisch einheitliche Substanz wanderte sowohl in Butanol/Essigsäure/Wasser als auch in Phenol/Wasser (NH₃) langsamer als die ursprüngliche. Wahrscheinlich war die ursprüngliche Aminosäure durch H₂O₂ zum entsprechenden Sulfoxyd oxydiert worden. Wenn man die mit H₂O₂ oxydierte Verbindung mit HJ + rotem P reduzierte (3 Stdn. bei Zimmertemperatur) wurde Jod frei. Es wurde mit Äther extrahiert. Die gebildete Aminosäure, auf Amberlit IR 120 abgetrennt und mit 1*n* NH₄OH eluiert, erwies sich auf einem zweidimensionalen Papierchromatogramm identisch mit der aus dem Peptid isolierten ursprünglichen Aminosäure.

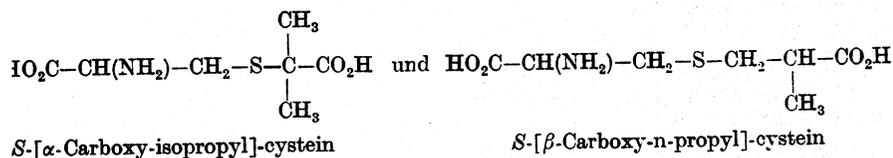
Entschwefelung der Aminosäure mit Raney-Nickel: Die Lösung von 100 mg der Aminosäure in 30 ml 90proz. Methanol wurde mit 2 g Raney-Nickel⁴ 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Filtrieren und Auswaschen des Nickelrück-

⁴ R. Mozingo, Org. Syntheses 21, 15 [1941].

stands mit 0,07*n* NaOH wurde die Lösung mit 2*n* H₂SO₄ angesäuert. Die flüchtigen Säuren wurden mit Wasserdampf abdestilliert und die Destillate mit 0,142*n* Ba(OH)₂ neutralisiert. Die vereinten Destillate wurden auf ein kleines Volumen eingeeengt. Die papierchromatographische Untersuchung mit Butanol/1,5*n* NH₄OH 1:1, wobei Na-Acetat, Na-*n*-Butyrat und Na-Isobutyrat als Vergleichsubstanzen dienten, zeigte, daß der Hauptteil der gebildeten Säuren genau wie Isobuttersäure wanderte. *n*-Buttersäure und Isobuttersäure ließen sich auf Whatman-1-Papier, das zuvor mit dem Lösungsmittel gewaschen war, gut voneinander trennen. Neben Isobuttersäure war auch etwas Essigsäure vorhanden.

Die durch Wasserdampfdestillation von den flüchtigen Säuren befreite Lösung ließ man durch eine Amberlit-IR-120 Säule (1,3 × 19 cm) fließen. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurden die Aminosäuren mit 1*n* NH₄OH von dem Harz eluiert. Auf einem 2-dimensionalen Papierchromatogramm war Alanin als einzige Aminosäure zu finden.

Die angeführten Experimente führten zu der Schlußfolgerung, daß die unbekannte schwefelhaltige Aminosäure, welche aus dem γ -Glutamylpeptid isoliert wurde, ein *S*-(Carboxy-propyl)-cystein ist. Da mit Raney-Nickel aus der Aminosäure Isobuttersäure entsteht, sind folgende Strukturen für die Aminosäure möglich



Diese Verbindungen und zum Vergleich dazu noch *S*-[γ -Carboxy-*n*-propyl]-cystein, das zwar nicht als die isolierte Aminosäure in Frage kommt, wurden synthetisch hergestellt.

Synthese von *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein: 878 mg L-Cystein-hydrochlorid · H₂O (Schwarz Laboratories Inc.) wurden in einem Gemisch von 5 ml 3*n* NaOH und 10 ml 96proz. Äthanol gelöst. Der Lösung wurde 1,5 ml α -Brom-isobuttersäure-äthylester (Fluka) zugesetzt. Nach Stehenlassen über Nacht wurde die Lösung mit konz. Salzsäure angesäuert (*p*_H < 3) und dann eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit 50 ml 96proz. heißem Äthanol extrahiert. Nach Eindampfen im Vak. wurden dem Rückstand 50 ml 1*n* HCl zugesetzt, die Lösung 5 Stdn. bei 100° gehalten und wieder im Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf einer Dowex-1-Säule (Acetatform, 1,7 × 20 cm) mit 0,5*n* Essigsäure fraktioniert. Fraktionen à 13 ml/30 Min. wurden gesammelt. *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein erschien in Frakt. 15–27. Nach Eindampfen im Vak. wurde der Rückstand aus Wasser-Aceton kristallisiert. Ausb. 640 mg.

S-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein: Einer Lösung von 7 g L-Cystein-hydrochlorid · H₂O und 4,5 g β -Brom-isobuttersäure (hergestellt nach Larsson⁵ aus Methacrylsäure) in 10 ml 96proz. Äthanol und 20 ml 3*n* NaOH wurden nach 40 Min. 2 ml 3*n* NaOH und nach 2 Stdn. noch 4 ml 3*n* NaOH zugesetzt. Nach 20stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur gab man 10 ml konz. Salzsäure zu. Dann wurde die Lösung im Vak. eingedampft und der Rückstand 3 mal mit 100 ml heißem 96proz. Äthanol extrahiert. Nach Eindampfen der Lösung löste man den Rückstand in Wasser. Versuche, die Aminosäure durch Zusatz von Aceton zur Kristallisation zu bringen, waren erfolglos. Die wäßr. Lösung wurde deshalb auf einer Dowex-1-Säule (Acetatform, 1,8 × 27 cm) mit 0,5*n* Essigsäure

⁵ E. Larsson, Chalmers Tekn. Högskolas Handl. 35, 1 [1944].

fraktioniert. *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein erschien in Frakt. 6—17. Nach Eindampfen im Vak. wurde die Aminosäure aus Wasser-Aceton kristallisiert. Ausb. 2,63 g.

S-[γ -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein wurde aus 1,76 g L-Cysteinhydrochlorid \cdot H₂O und 3 ml γ -Brom-*n*-buttersäure-äthylester analog der Herstellung von *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-cystein synthetisiert. Die Aminosäure kristallisierte bereits beim einengen der Fraktionen aus. Ausb. 1,5 g. Nach Umkristallisieren aus Wasser-Aceton war die Aminosäure rein.

Vergleich der natürlichen Peptid-Aminosäure mit den synthetischen Aminosäuren

Für den Vergleich wurden Butanol/Essigsäure/Wasser 63:10:27 und Phenol/Wasser (NH₃) verwendet. Im erstgenannten Lösungsmittel (Whatman 1, absteig. Chromatogramm, 48 Std., \sim 20°) wanderte *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein etwas schneller und *S*-[γ -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein etwas langsamer als die natürliche Aminosäure. *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein und die natürliche Aminosäure wanderten gleich schnell. Beim Mischungsversuch bildeten beide Aminosäuren einen einheitlichen Fleck. Auch mit Ninhydrin gaben die Flecken beider Aminosäuren genau denselben Farbton. *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein dagegen gab eine mehr blauviolette Färbung.

Mit Phenol/Wasser (NH₃) als Lösungsmittel und Whatman-4-Papier wanderten *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein und die natürliche Aminosäure gleich schnell. Der Farbton der mit Ninhydrin behandelten Flecken war genau dasselbe Violett-blaugrün. *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein wanderte etwas langsamer als die natürliche Aminosäure, *S*-[γ -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein wiederum etwas schneller. Der Farbton mit Ninhydrin war bei der erstgenannten Aminosäure blaugrün ohne violette Nuance, bei der letztgenannten braunviolett.

Die IR-Spektren von *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein und *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein bestätigten die Resultate der chromatographischen Untersuchung: Das IR-Spektrum der letztgenannten Aminosäure unterschied sich deutlich vom Spektrum der natürlichen Aminosäure. Dagegen waren die IR-Spektren von *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein und der natürlichen Aminosäure einander ähnlicher.

Die R_F -Werte und das optische Drehungsvermögen der Aminosäure sind in der Tabelle angeführt. Auf Grund der chemischen, papierchromatographischen und spektroskopischen Untersuchungen ist die schwefelhaltige Aminosäure des aus der Zwiebel isolierten γ -Glutamyltripeptids *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-L-cystein.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Gmelin⁶ aus den Samen von *Acacia Willardiana* kürzlich *S*-[β -Carboxyäthyl]-L-cystein isoliert und strukturell aufgeklärt hat. Er hat in diesen Samen dazu noch eine andere *S*-haltige Aminosäure papierchromatographisch nachgewiesen, die er mit Vorbehalt als *S*-[γ -Carboxypropyl]-L-cystein bezeichnete. Diese Aminosäure ist nicht identisch mit unserer aus γ -Glutamylpeptid II isolierten Aminosäure und auch nicht mit den von uns synthetisch hergestellten Aminosäuren.

Strukturaufklärung des Peptids

Hydrolyse: Das Peptid wurde durch 1stdg. Erhitzen mit 0,1*n* HCl auf 100° nur sehr wenig hydrolysiert. Auf dem Papierchromatogramm waren schwache Flecke von Glutaminsäure und Glycin zu beobachten. Der Fleck der *S*-haltigen Aminosäure war äußerst schwach. Bei 3stdg. Erhitzen in 1*n* HCl wurde es vollständig gespalten. Neben den starken Flecken von Glutaminsäure, Glycin und der

⁶ R. Gmelin, diese Z. 816, 164 [1959].

S-haltigen Aminosäure war ein schwächerer Fleck auf dem Chromatogramm sichtbar, welcher in Phenol/Wasser (NH₃) gleich schnell und in Butanol/Essigsäure/Wasser etwas langsamer als die S-haltige Aminosäure wanderte. Dieser Fleck färbte sich mit Ninhydrin rotviolett wie die meisten Aminosäuren. Es ist möglich, aber nicht bewiesen, daß dieser Fleck das Dipeptid, *S*-[β -Carboxy-n-propyl]-L-cysteinyl-glycin war. Ein anderer schwacher Fleck war nahe Glutaminsäure erkennbar.

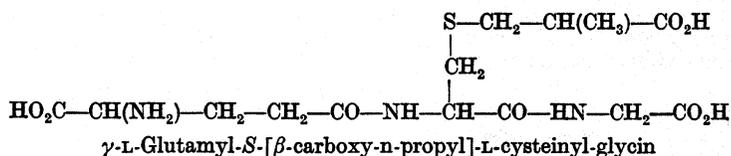
Bei der Hydrolyse sowohl in 1*n* als 6*n* HCl bei 100° während 24 Stdn. wurden nur Glutaminsäure, *S*-[β -Carboxy-n-propyl]-cystein und Glycin gebildet. Die Hydrolysen erfolgten stets im zugeschmolzenen Rohr.

Bei der Bestimmung von α -Carboxylgruppen mit Ninhydrin nach Linko³ wurde aus dem Peptid 10,70% CO₂ gebildet; ber. 11,2% für Carboxylgruppe. 3,76% N wurde als Ammoniak abgespalten; ber. 3,56% N pro 1 α -NH₂-Gruppe.

N-Terminale Aminosäure: Nach der Reaktion mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol und darauffolgende Hydrolyse wurde im Ätherextrakt DNP-Glutaminsäure gefunden. Es sei erwähnt daß DNP-*S*-[β -Carboxy-n-propyl]-L-cystein auf dem Papierchromatogramm zwei Flecke bildet, von welchem der eine nur ein wenig, der andere dagegen deutlich schneller als DNP-Glutaminsäure wanderte.

Synthese von Peptid II

Nach den mitgeteilten Resultaten sollte das aus Zwiebeln isolierte Peptid die folgende Struktur haben



Das Peptid wäre somit ein am Schwefelatom substituiertes Glutathion. Die Synthese des neuen Peptids sollte demnach aus Glutathion und β -Brom-isobuttersäure möglich sein. Die Synthese wurde folgendermaßen ausgeführt.

120 mg Glutathion (L. Light & Co) und 80 mg β -Brom-isobuttersäure wurden in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben in 1 ml 96proz. Äthanol und 2 ml 1*n* NaOH unter Schütteln gelöst. Nach 18stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden 5 ml Wasser zugesetzt. Anschließend ließ man die Lösung durch eine Amberlit-IR-120-Säule (1,7 \times 10 cm) fließen. Nach Waschen mit Wasser eluierte man mit 200 ml 1*n* NH₄OH. Das Eluat wurde im Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst. Die Papierchromatogramme der Lösung zeigten, daß bei der Synthese eine ninhydrinpositive Substanz entstanden war, welche in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen wie das aus Zwiebeln isolierte Peptid wanderte. Auch andere ninhydrinpositive Flecke waren auf dem Chromatogramm zu finden (oxydiertes Glutathion, das schon in sehr kleinen Mengen in dem benützten Glutathion-Präparat vorhanden war, dazu noch ein Fleck, der in Butanol/Essigsäure/Wasser etwas schneller und ein weiterer, der etwas langsamer wanderte als das Peptid).

Es wurde nun eine zweite Portion von 120 mg Glutathion und 80 mg β -Brom-isobuttersäure in derselben Weise behandelt. Die erhaltenen Produkte wurden nach Abdampfen des Ammoniaks vereinigt, in 20 ml Butanol/Essigsäure/Wasser gelöst und auf einer Cellulosesäule (5 \times 41 cm) mit demselben Lösungsmittel fraktioniert. Es wurden Fraktionen à 14 ml/35 Min. aufgefangen. In Frakt. 57—100 erschien das Peptid, welches mit dem aus der Zwiebel isolierten Peptid chromatographisch

identisch war. Diese Fraktionen wurden im Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst. Das Peptid konnte aus Wasser/Methanol/Aceton kristallisiert werden. Ausbeute 130 mg. Die chromatographische Untersuchung in verschiedenen Lösungsmitteln bestätigte die Einheitlichkeit der Verbindung und ihre Identität mit dem natürlichen Peptid. Die IR-Spektren des synthetischen und natürlichen Peptids waren sehr ähnlich.

Vergleichende Hydrolyse des synthetischen und natürlichen Peptids

Folgende Lösungen (Volumen 0,5 ml) wurden in zugeschmolzenen Glasröhren 3 Stdn. bei 102° gehalten:

1. 0,5 mg natürliches Peptid in 0,5*n* HCl
2. 0,5 mg synthetisches Peptid in 0,5*n* HCl
3. 0,5 mg natürliches Peptid in 1,0*n* HCl
4. 1,0 mg synthetisches Peptid in 1,0*n* HCl

Die Lösungen wurden im Vak. eingedampft, die Rückstände, in Wasser gelöst und papierchromatographisch untersucht. Die Chromatogramme der Hydrolysate des synthetischen und natürlichen Peptids waren identisch. Die Flecke des Glycins und *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-cysteins waren stärker auf den Chromatogrammen von Hydrolysaten mit 1*n* HCl als mit 0,5*n* HCl. Ein Teil von dem Fleck des *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-cysteins war auf allen Chromatogrammen mit Ninhydrin rotviolett gefärbt, was darauf deutet, daß in den Hydrolysaten das Dipeptid *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-*L*-cysteinyl-glycin vorhanden ist. Die normalen α -Peptidbindungen werden allgemein noch nicht in 1*n* HCl hydrolysiert und es ist darum zu erwarten, daß in γ -Glutamylpeptiden bei schwacher Säurehydrolyse nur die γ -Peptidbindung hydrolysiert wird. Virtanen und Ettala⁷ konnten tatsächlich beweisen, daß aus 1 Mol γ -Glutamyl-valyl-glutaminsäure nach Hydrolyse in 0,5*n* HCl bei 100° 1 Mol Glutaminsäure und das α -Peptid, Valyl-glutaminsäure entstehen. Dieses Dipeptid wurde erst in 6*n* HCl hydrolysiert. In Cystein-Peptiden scheint jedoch die α -Peptidbindung labiler zu sein. Glutathion z. B. wird in 1*n* HCl hauptsächlich zu Glutaminsäure, Cystein bzw. Cystin und Glycin hydrolysiert. So scheint es auch zum großen Teil mit unserem neuen Glutathionderivat zu sein. Der Fleck, der in Phenol/Wasser (NH₃) gleich schnell und in Butanol/Essigsäure/Wasser etwas langsamer als *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-cystein wandert und darum teilweise mit dem Fleck dieser Aminosäure zusammenfällt, kann das erwartete Dipeptid sein. Wie schon oben gesagt, ist das noch nicht bewiesen. Die Menge dieses Peptids ist jedenfalls klein.

In der Tabelle sind die R_F -Werte und die optischen Drehungen der neuen, aus Zwiebeln isolierten Verbindungen zu sehen.

R_F - und $[\alpha]_D$ -Werte der aus der Zwiebel isolierten γ -Glutamylpeptide I und II und des neuen Cysteinderivats. Absteig. Chromatogramme, Whatman-1-Papier, ~ 20°. Zum Vergleich sind die R_F -Werte von Alanin und Glutaminsäure mit aufgeführt.

Lösungsmittel	γ -L-Glutamyl-L-phenylalanin	γ -L-Glutamyl- <i>S</i> -[β -carboxy- <i>n</i> -propyl]-L-cysteinyl-glycin	<i>S</i> -[β -Carboxy- <i>n</i> -propyl]-L-cystein	Glutaminsäure	Alanin
Butanol/Essigsäure/Wasser 63:10:27	0,57	0,31	0,41	0,20	0,27
Phenol/Wasser (NH ₃ atm) 1000:365	0,60	0,33	0,42	0,23	0,57
Drehung (in Wasser)	$[\alpha]_D^{20} : + 17,3$	$[\alpha]_D^{22} : -38,1$	$[\alpha]_D^{21} : - 50,1$		

⁷ A. I. Virtanen u. T. Ettala, Acta chem. scand. 12, 787 [1958].

Einwirkung von Nierenhomogenat auf Peptid II

In Nierenhomogenat^{8,9}, aber wahrscheinlich auch in Erbsenkeimlingen¹⁰, ist ein Enzym vorhanden, das den γ -Glutamylrest des Glutathions z. B. auf L-Alanin unter Bildung von γ -L-Glutamyl-L-alanin überträgt (vgl. Diskussion S. 17). Wir versuchten nun, ob auch unser Peptid II als Substrat für diese Reaktion dienen kann und ob in der Zwiebelpflanze eine solche γ -Glutamyl-Transferase vorhanden ist.

26 g Rindernieren wurden in 43 ml *m*/15 Phosphatpuffer, p_H 7,4, mit 0,001 *m* MgSO₄ homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und danach bei + 5° gegen denselben Puffer dialysiert⁸. In Proberöhrchen wurden 0,5 ml Dialysat, 0,5 ml Peptidlösung (0,02 mMol) und 0,5 ml Alaninlösung (0,02 mMol) pipettiert.

1.	2.	3. (Kontrolle)
Dialysat	Dialysat	Dialysat
+ γ -Glutamylpeptid II	+ Glutathion	+ Wasser (1 ml)
+ Alanin	+ Alanin	

Nach 2 stdg. Inkubation unter Stickstoff bei 30° setzte man 5 ml heißen Äthanol zu und zentrifugierte. Die Lösungen wurden im Vak. eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und papierchromatographisch untersucht. Je $\frac{1}{10}$ der Lösung wurde für ein zweidimensionales Chromatogramm angewendet.

In Ansatz 1 wurden neben γ -Glutamylpeptid II und Alanin Glutaminsäure, Glycin, *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-cystein und γ -Glutamyl-alanin, in Ansatz 2 neben Glutathion und Alanin Glutaminsäure, Glycin, Cystein und γ -Glutamyl-alanin gefunden.

Bei den entsprechenden Versuchen mit Zwiebel-Homogenaten bzw. -Dialysaten, welche sowohl aus ruhenden Zwiebeln als auch aus grünen Blättern hergestellt waren, konnte keine γ -Glutamyl-Transferase-Wirkung gefunden werden, d. h. der Fleck von γ -Glutamyl-alanin wurde auf Papierchromatogrammen nie beobachtet.

Diskussion

Von den γ -Glutamylpeptiden wurde das metabolisch wichtige Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin) durch Hopkins¹¹ isoliert und strukturell aufgeklärt. Andere γ -Glutamylpeptide sind erst vor einigen Jahren bekannt geworden, wenn man von den Kapselsubstanzen der Bakterien absieht, welche z. B. bei *Bacillus subtilis* eine Mischung von L- γ - und D- γ -Glutamylpolypeptiden darstellen. Virtanen und Berg¹⁰ haben 1954 in keimenden Erbsensamen die Bildung einer ninhydrinpositiven Substanz beobachtet, welche auf Grund ihrer leichten hydrolytischen Spaltbarkeit in Glutaminsäure und Alanin als γ -Glutamyl-alanin erkannt wurde. Waley¹² isolierte aus der Augenlinse des Kalbes ein saures Peptid, das sich als γ -L-Glutamyl-L- α -amino-butyryl-glycin erwies. Ferner haben wir aus *Juncus*

⁸ C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood, Nature [London] 166, 288 [1950]; Biochem. J. 51, 25 [1952].

⁹ F. J. R. Hird u. P. H. Springell, Biochem. J. 56, 417 [1954].

¹⁰ A. I. Virtanen u. A. M. Berg, Acta chem. scand. 8, 1089 [1954].

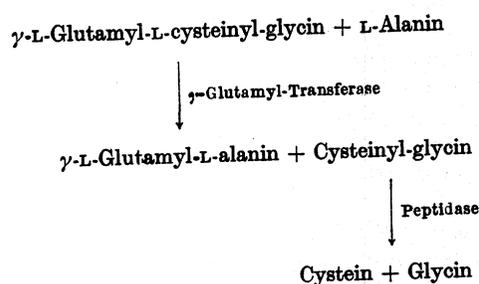
¹¹ F. G. Hopkins, Biochem. J. 15, 286 [1921]; J. biol. Chemistry 84, 269 [1929].

¹² S. G. Waley, Biochem. J. 64, 715 [1956].

conglomeratus ein saures γ -Glutamylpeptid isoliert¹³, welches sich als γ -Glutamyl-valyl-glutaminsäure erwies⁷. Aus verschiedenen Bohnenarten wurde γ -Glutamyl-S-methyl-cystein isoliert und die Struktur aufgeklärt^{14,15}. Auch das entsprechende Peptid mit S-Methyl-cysteinsulfoxyd wurde papierchromatographisch nachgewiesen; es ist jedoch möglicherweise ein Artefakt. Rinderknecht et al.¹⁵ haben auch das Vorkommen von γ -Glutamyl-leucin in Bohnen wahrscheinlich gemacht.

Wir haben nun in Zwiebeln mindestens fünf γ -Glutamylpeptide nachgewiesen und vier davon rein dargestellt. Zwei dieser Peptide wurden in vorliegender Arbeit eingehend untersucht. Die anderen in kristalliner Form isolierten Peptide sind: γ -Glutamyl-S-methyl-cystein und ein γ -Glutamylpeptid $C_{11}H_{20}N_2O_7S$, das eine neue S-haltige Aminosäure enthält, deren Struktur noch nicht aufgeklärt ist*.

Es erhebt sich nun die Frage, welche Bedeutung diese γ -Glutamylpeptide im Stickstoffmetabolismus der Pflanzen und Tiere haben. Hanes, Hird und Isherwood⁸, sowie Hird und Springell⁹ haben gefunden, daß Nierenextrakt eine Reaktion zwischen reduziertem Glutathion und L-Aminosäuren vermittelt, wobei Cysteinyl-glycin im Glutathionmolekül mit den Aminosäuren ausgetauscht wird:



Virtanen und Berg¹⁰ konnten die Austauschreaktion auch in Erbsenkeimlingen wahrscheinlich machen. Es ist darum möglich, daß γ -Glutamyl-alanin in den Keimlingen aus Glutathion und Alanin entsteht.

Unsere Versuche, die Austauschreaktion zwischen unserem γ -Glutamylpeptid II und Alanin mit einem durch Dialyse hergestellten Enzympräparat aus Rindernieren-Homogenat nachzuweisen, waren erfolgreich. Auf dem zweidimensionalen Papierchromatogramm mit Butanol/Essigsäure/Wasser und Phenol/Wasser (NH_3) wurde ein Fleck an der Stelle gefunden, wo Virtanen und Berg γ -Glutamyl-alanin fanden (das Peptid wandert etwas schneller als Glutaminsäure in beiden Lösungsmitteln).

* Zusatz b. d. Korr.: Dazu haben wir noch γ -Glutamyl-valin und γ -Glutamyl-isoleucin neben zwei anderen, strukturell noch nicht aufgeklärten γ -Glutamylpeptiden aus der Zwiebel isoliert.

¹³ A. I. Virtanen, *Kemiantutkimus-Säätiön Vuosikertomus* 1956, 8.

¹⁴ C. J. Morris u. J. F. Thompson, *Arch. Biochem. Biophysics* 73, 281

[1958].

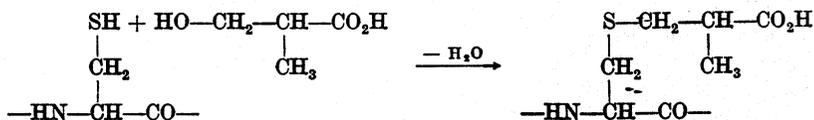
¹⁵ M. Rinderknecht, D. Thomas u. S. Aslin, *Helv. chim. Acta* 41, 1 [1958].

Derselbe Fleck entstand auch aus Glutathion und Alanin mit demselben Nierenpräparat. Das natürliche γ -Glutamyl-*S*-[β -carboxy-*n*-propyl]-cysteinyl-glycin beteiligt sich demnach an der Austauschreaktion wie Glutathion.

Mit Zwiebelhomogenaten und Dialysaten konnten wir die Reaktion jedoch weder mit Glutathion + Alanin noch mit unserem γ -Glutamylpeptid II + Alanin zustandebringen. Es wurden bei diesen Versuchen sowohl ruhende Zwiebeln als grüne Sprößlinge und Blätter angewendet. Die Bildung von γ -Glutamyl-alanin war in zahlreichen Versuchen nie zu beobachten. Demnach scheint die Zwiebel keine γ -Glutamyl-Transferase zu enthalten. Es ist jedoch auch möglich, daß das Enzym in Zwiebelhomogenat instabil ist. Die Frage muß noch weiter untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß mit Zwiebelhomogenat und γ -Glutamyl-*S*-[β -carboxy-*n*-propyl]-cysteinyl-glycin + Alanin ein relativ starker Fleck auf dem zweidimensionalen Papierchromatogramm oberhalb des Glutaminsäure-Flecks zwischen Serin und Asparaginsäure erscheint. Die nicht näher untersuchte Substanz könnte oxydiertes ($S \rightarrow SO$) γ -Glutamylpeptid II sein.

Die Bedeutung der γ -Glutamylpeptide im Stickstoffmetabolismus ist noch unbekannt. Ihre mögliche Rolle bei Transpeptidierungs-Reaktionen ist schon früher diskutiert worden¹⁶. Experimentelle Beweise dafür, daß diese Peptide wichtige Faktoren im Aufbau der Proteine sein könnten, fehlen jedoch. Das Vorkommen einer überraschenden Anzahl verschiedener γ -Glutamylpeptide in der ruhenden Zwiebel und ihr schnelles Verschwinden beim Austreiben der Zwiebel erweckt neues Interesse für diese Glutaminanalogen und ihre Aufgabe.

Der Umstand, daß *S*-[β -Carboxy-*n*-propyl]-cystein in der Zwiebel nicht als freie Aminosäure sondern nur als ein Bestandteil des γ -Glutamylpeptids zu finden ist, weist möglicherweise darauf hin, daß dieses Cysteinderivat im Glutathionmolekül aus dem Cysteinrest synthetisiert wird, z. B. in folgender Weise:



S-*n*-Propylcysteinsulfoxyd, das als freie Aminosäure in der Zwiebel vorkommt, könnte daraus durch Decarboxylierung und Oxydation entstehen. Wenn es so wäre, sollte man erwarten, daß *S*-Methyl-cysteinsulfoxyd in analoger Weise aus dem Cysteinrest des Glutathions und der Glykolsäure entsteht. Erst Experimente mit markierten Substanzen können Klarheit über diese Fragen bringen.

¹⁶ J. S. Fruton, Yale J. Biol. Med. 22, 263 [1950]; C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood, Nature [London] 166, 288 [1950].

Die zahlreichen γ -Glutamylpeptide kommen in *Allium cepa* nur in den Zwiebeln und nur im Ruhestadium vor. Sobald die angefeuchteten Zwiebeln austreiben und grüne Blätter bilden, verschwinden die γ -Glutamylpeptide. In den grünen Teilen sind sie nicht zu finden. Sobald aber neue kleine Tochterzwiebeln gebildet werden, treten die Peptide wieder in diesen auf. Es scheint also, daß die γ -Glutamylpeptide Reservestoffsubstanzen in den ruhenden Zwiebeln sind und aktiv an dem Stickstoffmetabolismus teilnehmen, wenn die Zwiebeln austreiben. Von dem Mechanismus dieser Beteiligung wissen wir nichts.

Zusammenfassung

Mindestens fünf verschiedene γ -Glutamylpeptide wurden in der Küchenzwiebel (*Allium cepa*) chromatographisch festgestellt. Vier von diesen wurden kristallin erhalten. Die Isolierung, die chemischen, chromatographischen und optischen Eigenschaften von Peptid I und II werden eingehend beschrieben. Peptid I wurde als γ -L-Glutamyl-L-phenylalanin erkannt.

Peptid II enthält eine bisher unbekannt, S-haltige Aminosäure, welche in der Zwiebel nicht frei vorkommt. Nach Reindarstellung der Aminosäure wurde diese durch chemische und chromatographische Charakterisierung sowie durch Synthese als *S*-[β -Carboxy-n-propyl]-L-cystein identifiziert. Außerdem wurden zum chromatographischen Vergleich *S*-[α -Carboxy-isopropyl]-L-cystein und *S*-[γ -Carboxy-n-propyl]-L-cystein synthetisiert.

Für das Peptid II wurde die Struktur γ -L-Glutamyl-*S*-[β -carboxy-n-propyl]-L-cysteinyl-glycin ermittelt und durch Synthese aus Glutathion und β -Brom-isobuttersäure bestätigt.

Die γ -Glutamylpeptide kommen nur in den Zwiebelknollen und nur im Ruhestadium vor. Sie verschwinden, wenn die Zwiebeln austreiben. In den kleinen Tochterzwiebeln werden sie wieder gebildet. In Zwiebelhomogenaten war γ -Glutamyltransferase nicht zu finden. Die Bedeutung der γ -Glutamylpeptide im N-Metabolismus wird diskutiert.

Summary

At least five different γ -glutamyl peptides have been found in onion (*Allium cepa*) by chromatography. Four of these have been isolated in crystalline form. The isolation, and the chemical, chromatographic, and optical properties of peptides I and II are described in detail. The structure γ -L-glutamyl-L-phenylalanine was established for peptide I.

Peptide II contains a hitherto unknown S-containing amino acid which does not occur in the onion in free form. After purification, the amino acid was characterised chemically and by chromatography. It was assigned the structure *S*-[β -carboxy-n-propyl]-L-cysteine, which was

confirmed by synthesis. In addition *S*-[α -carboxy-isopropyl]-L-cysteine and *S*-[γ -carboxy-n-propyl]-L-cysteine were prepared synthetically as chromatographic standards.

The structure γ -L-glutamyl-*S*-[β -carboxy-n-propyl]-L-cysteinyl-glycine was established for peptide II and confirmed by synthesis from glutathione and β -brom-iso-butyric acid.

The γ -glutamyl peptides are found in onion only in the bulbs. They disappear when the onion begins to sprout and are not to be found in the green parts. They are formed again in the small daughter bulbs. γ -Glutamyltransferase was not found in onion homogenates. The importance of the γ -glutamyl peptides in nitrogen metabolism is discussed.

Professor Dr. A. I. Virtanen, Biochemisches Institut der Stiftung für Chemische Forschung, Helsinki, Kalevankatu 56, Finland.